

Modification of Microbial Fuel Cell Anodes via Nitric Acid and Hydrogen Peroxide Treatment for Electrogenic Biofilm Formation

Gladysheva M.S., Molodkina N.R.
ITMO University
Saint-Petersburg, Russian Federation

Abstract. The primary objectives of this study are to evaluate the influence of modifying carbon felt electrodes on the formation of microbial electrogenic biofilm and the efficiency of bioelectrogenesis in a two-chamber microbial fuel cell. Microbial fuel cells represent an alternative energy technology that enables the conversion of organic matter into electricity through microbial metabolism. However, their practical application has been limited by low energy efficiency and instability. This research aims to enhance the efficiency of microbial fuel cells by modifying the anodes, which may contribute to the broader adoption of these systems within sustainable energy development. To achieve these objectives, the following tasks were addressed: modification of anodes using a mixture of HNO_3 and H_2O_2 to improve the hydrophilic properties and biocompatibility of the electrode surface; long-term recording of the system's output voltage to assess the dynamics of electricity generation and to establish correlations between biofilm formation stages and output voltage; and analysis of biofilm structures using light and scanning electron microscopy. Key findings include quantitative indicators of output voltage from two microbial fuel cell configurations. The system with the modified anode demonstrated a significant advantage, exhibiting an output voltage 2.70 to 2.75 times higher than that of the system with untreated carbon felt. The significance of these results lies in confirming the effectiveness of the electrode modification method used, which may facilitate the implementation of microbial fuel cells as alternative energy sources for low-power autonomous devices.

Keywords: microbial fuel cell, bioelectrogenesis, electrogenic biofilm, microbial adhesion, electrode modification, carbon felt.

DOI: <https://doi.org/10.52254/1857-0070.2025.3-67.08>

UDC: 620.951, 579.262

Modificarea anozilor ai pilelor de combustie microbieni prin tratare cu acid azotic și peroxid de hidrogen pentru formarea biofilmului electrogen

Gladysheva M.S., Molodkina N.R.

Universitatea ITMO, Sanct-Petersburg, Federația Rusă

Rezumat. Obiectivele principale ale acestui studiu sunt de a evalua influența modificării electrozilor din pâslă de carbon asupra formării biofilmului electrogen microbial și a eficienței bioelectrogenezii într-o pilă de combustie microbială cu două camere. Pilele de combustie microbiene reprezintă o tehnologie energetică alternativă care permite conversia materiei organice în electricitate prin metabolismul microbial. Cu toate acestea, aplicarea lor practică a fost limitată de eficiența energetică scăzută și instabilitate. Această cercetare își propune să sporească eficiența pilelor de combustie microbiene prin modificarea anozilor, ceea ce poate contribui la adoptarea pe scară largă a acestor sisteme în cadrul dezvoltării energiei durabile. Pentru a atinge aceste obiective, au fost abordate următoarele sarcini: modificarea anozilor folosind un amestec de HNO_3 și H_2O_2 pentru a îmbunătăți proprietățile hidrofile și biocompatibilitatea suprafeței electrodului; înregistrarea pe termen lung a tensiunii de ieșire a sistemului pentru a evalua dinamica generării de electricitate și pentru a stabili corelații între etapele de formare a biofilmului și tensiunea de ieșire; și analiza structurilor biofilmului folosind microscopia optică și microscopia electronică de scanare. Principalele constatări includ indicatori cantitativi ai tensiunii de ieșire din două configurații de pile de combustie microbiene. Sistemul cu anod modificat a demonstrat un avantaj semnificativ, prezentând o tensiune de ieșire de 2.70 până la 2.75 ori mai mare decât cea a sistemului cu pâslă de carbon netratată. Semnificația acestor rezultate constă în confirmarea eficacității metodei de modificare a electrodului utilizată, care poate facilita implementarea pilelor de combustie microbiene ca surse alternative de energie pentru dispozitive autonome de consum redus de energie.

Cuvinte-cheie: pilă de combustie microbială, bioelectrogenză, biofilm electrogen, aderență microbială, modificarea electrodului, pâslă de carbon.

Модификация анодов микробного топливного элемента путем обработки азотной кислотой и перекисью водорода для формирования электрогенной биоплёнки
Гладышева М.С., Молодкина Н.Р.

Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Аннотация. Основными целями исследования являются оценка влияния модификации электродов из углеродного войлока на формирование электрогенной биоплёнки микроорганизмов и эффективности биоэлектрогенерации в двухкамерном микробном топливном элементе. Микробные топливные элементы являются альтернативной энергетической технологией, позволяющей преобразовывать органические вещества в электроэнергию за счёт метаболизма микроорганизмов. Однако их практическое применение ограничено низкой энергоэффективностью и нестабильностью. Данное исследование направлено на повышение эффективности микробного топливного элемента путём модификации анодов, что может способствовать дальнейшему широкому использованию данных систем в рамках развития направлений устойчивой энергетики. Для достижения поставленных целей решались следующие задачи: модификация анодов смесью HNO_3 и H_2O_2 для улучшения гидрофильных свойств и биосовместимости поверхности электродов, регистрация выходного напряжения системы в течение длительного времени для оценки динамики генерации электроэнергии и установления зависимостей между стадиями образования биоплёнки и выходного напряжения, а также анализ структуры биоплёнок с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии. Важными результатами являются количественные показатели выходного напряжения двух конфигураций микробных топливных элементов. Система с модифицированным анодом продемонстрировала значительное преимущество, показав выдаваемое напряжение в 2,70–2,75 раза выше, чем система с необработанным углеродным войлоком. Кроме того, скорость нарастания напряжения для модифицированного анода в 2.90–2.95 раза выше по сравнению с необработанным анодом, свидетельствуя об ускоренной кинетике формирования электрогенной биоплёнки и оптимизации процессов переноса электронов. Микроскопия выявила более быстрое формирование плотных и однородных биоплёнок на модифицированном электроде, где размеры биоплёнки составили от 10 до 15 мкм против 4–6 мкм на необработанном электроде. Значимость результатов заключается в подтверждении эффективности используемого способа модификации электродов для работы микробных топливных элементов, что может способствовать их внедрению в качестве источников альтернативной энергии для маломощных автономных устройств.

Ключевые слова: микробный топливный элемент, биоэлектрогенерация, электрогенная биоплёнка, адгезия микроорганизмов, модификация электрода, углеродный войлок.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день биоплёнки находят широкое применение в разнообразных биотехнологических процессах, включая методы биоремедиации загрязнённых территорий, очистку промышленных стоков и выщелачивание металлов. Среди перспективных форм биоплёнок выделяется электроактивная биоплёнка, представляющая собой ключевой компонент современных биоэлектрохимических систем, функционирующих на основе принципов микробной электролитической активности.

Преобразование органических соединений в энергию с использованием биоэлектрохимических систем (БЭС) представляет собой одно из активно развивающихся направлений современной биотехнологии [1]. Микробный топливный элемент (МТЭ) является разновидностью БЭС благодаря способности использовать метаболическую активность микроорганизмов для расщепления органических соединений с одновременной генерацией электроэнергии. Ключевую роль в функцио-

нировании МТЭ имеет формирование на поверхности электродов, входящих в конструкцию элемента, электрогенной микробной биоплёнки. Электрогенные микроорганизмы, входящие в её состав, осуществляют биокаталитическое окисление органических субстратов с переносом электронов на электрод (чаще всего на анод), обеспечивая тем самым непрерывный биоэлектрический ток [2]. Формирование биоплёнки данных микроорганизмов на поверхности электрода (в основном анода) является необходимым условием для сбора достаточного количества метаболических электронов от окисления органических соединений в исследуемом субстрате для выработки энергии от МТЭ. Существенное влияние на эффективность работы МТЭ оказывает также состав и структура электродных материалов. Наибольший интерес представляют углеродсодержащие материалы (графит, углеродные ткани, углеродные нанотрубки), обладающие высокой электропроводностью, биосовместимостью и способностью поддерживать устойчивые микробные сообщества. Также разрабатываются компо-

зитные электроды на основе углеродно-металлических и полимерных структур, позволяющие улучшить электрохимические характеристики и долговечность системы [3].

Целью настоящего исследования является оценка влияния модификации анодов на основе углеродного войлока на формирование электрогенной микробной биоплёнки и параметры биоэлектрогенерации в МТЭ. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации конструкции МТЭ в целях повышения их энергоэффективности и устойчивости.

Влияние модификации электрода на эффективность электрогенерации. Для повышения эффективности электрогенерации электроды можно модифицировать, улучшая их гидрофильные свойства, пористость и другие характеристики [4]. Рассматривая скорость образования биоплёнки, выделяют следующие этапы: присоединение планктонных бактерий друг к другу и к поверхности происходит в течение нескольких минут. На следующем этапе образуются соединенные микроколонии, что может занять 2–4 часа. Далее в течение 6–12 часов прикрепленные клетки начинают выделять внеклеточные полисахариды, что делает формирующуюся биоплёнку устойчивой к внешним воздействиям. Окончательное формирование биоплёнки продолжается в течение 24–72 часов, в зависимости от условий роста и видов бактерий. После достижения максимальной зрелости микроколоний, биоплёнка будет обновляться за счет дисперсии планктонных клеток [5].

Каждый из описанных этапов сказывается на выдаваемом напряжении, так на начальной фазе прикрепления бактерий и образования микроколоний наблюдается снижение потенциала, т.к. бактериальное сообщество еще не устойчиво и отбора электроактивных клеток еще не произошло [6]. На стадии активного деления бактерий внутри биоплёнки напряжение активно возрастает, что свидетельствует об экспоненциальной фазе роста бактерий внутри матрикса, что в свою очередь влияет на улучшение переноса электронов [7]. Максимальная электроактивность может быть достигнута на стадии окончания формирования зрелой биоплёнки [8]. После достижения предельных значений напряжения бактериальная плёнка стабилизируется, процессы обновления биоплёнки и дисперсии отдельных клеток будут компенсированы, при

этом продолжительность непрерывной работы МТЭ будет зависеть от внешних условий, наличия питательных элементов в среде и скоростью старения биоплёнки. На завершающей стадии можно наблюдать постепенное снижение активности электрогенерации, что связано с процессами старения бактериальной плёнки и накопления токсичных метаболитов [9].

Процесс образования биоплёнки на анодной поверхности. Биоплёнки представляют собой ассоциации бактериальных клеток, реализующих разнообразные метаболические процессы. Процесс адгезии характеризуется высокой сложностью и детерминруется рядом факторов, среди которых химический состав питательного раствора, физико-химические свойства поверхности субстрата, структура внешней мембраны клетки и прочие параметры. Формирование биоплёнок способствует повышению эффективности функционирования микробиологических топливных элементов посредством прямого транспорта электронов от микроорганизмов к электродной поверхности.

Существует несколько механизмов переноса электронов от электрообразующих бактерий к электроноакцепторным структурам (в частности, к проводящим электродам в контексте биоэлектроэнергетических систем). Данные механизмы условно классифицируются на две группы: опосредованный (непрямой) транспорт электронов и непосредственный (прямой) перенос электронов. Однако рассматривая процесс образования биоплёнки, сформированной консорциумом активного ила, нельзя точно сказать, какой механизм доминирует в процессе формирования.

При реализации непрямого переноса электронов за счет окислительно-восстановительных медиаторов, обеспечивающих электронный обмен между внутриклеточным пространством микроорганизма и поверхностью электрода. В качестве посредников могут выступать восстановительные/окисленные формы молекул, последовательно проходящих стадии восстановления-окисления и реализующих перемещение электронов в двух направлениях – от микробной клетки к электроду и наоборот [10, 11]. Примером такого переноса могут быть бактерии, такие как *Shewanella oneidensis*, которые могут производить свои собственные окислительно-восстановительные медиаторы.

С другой стороны, механизм прямого переноса возможен за счет реализации непосредственного контакта электрода с бактериальными клетками. Такой контакт обеспечивается путём взаимодействия белковых комплексов наружной мембраны бактерии, обладающих электронной проводимостью, либо формированием специфической электропроводящей сети (бактериальные нанопровода) – внеклеточные проводящие связи [12].

Формирование биоплёнок представляет собой многостадийный процесс, включающий последовательное развитие различных морфологических и физиологических состояний бактериальных клеток. Первоначальная стадия характеризуется миграцией микроорганизмов к абиотической поверхности, которая осуществляется либо активно (в результате самостоятельного перемещения планктонных бактерий), либо пассивно (под воздействием внешних факторов, таких как броуновская диффузия, сила тяжести и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия). Природа адгезионных взаимодействий между бактериями и поверхностью определяется физико-химическими свойствами последней, такими как гидрофобность, заряд и шероховатость. Следующая фаза заключается в начальном обратимом взаимодействии планктонной популяции с субстратом посредством специализированных поверхностных структур клетки – пилей, фимбрий и флагелл, обеспечивающих первичное закрепление и индуцирующих адаптивные фенотипические модификации клеток. После достижения устойчивого уровня сцепления наступает переход к стадии необратимого прикрепления, завершающей ранний этап формирования зрелой структуры биоплёнки. После этого обратимое прикрепление переходит в необратимое, что становится ключевым моментом в развитии биоплёнки. Одной из ключевых особенностей в сформированной биоплёнке является образование экзополисахаридов (ЭПС) или внеклеточного матрикса. Данные вещества образуют защитный слой, предохраняющий биоплёнку от внешних воздействий. В биоплёнке также происходят такие процессы, как изменение метаболизма, подавление генов, отвечающих за синтез жгутиков, и повышение устойчивости к ультрафиолетовому излучению. Матрица ЭПС препятствует проникновению антибиотиков к клеткам и защищает бактерии от неблагоприятных факторов окружающей среды. После формирования

ЭПС начинается созревание биоплёнки, которое во многом определяется механизмом кворум-зависимой регуляции. Уникальная архитектура биоплёнки, характерная для определённых бактерий, складывается только после активации этого механизма [13].

Модификация поверхности электродов. Модифицирование поверхностей электродов позволяет целенаправленно регулировать важнейшие физико-химические параметры, включая следующие значимые характеристики:

1. Гидрофильность: уровень гидрофильных свойств определяет интенсивность взаимодействий на границе раздела фаз. Повышение степени гидрофильности способствует увеличению адсорбционной способности молекулярной воды на электродной поверхности, способствуя формированию стабильных структур биоплёнок и облегчая транспортировку электронов от микроорганизмов непосредственно к электродному материалу. Согласно результатам исследования Ю Чжао, Янь Ма, Тин Ли и соавторов, применение идентичной процедуры обработки углеродного войлока обеспечивает снижение угла смачивания поверхности практически до нулевого значения, что свидетельствует о достижении эффекта супергидрофильности данного материала. В свою очередь, угол контакта воды с поверхностью необработанного войлока превышает отметку в 120° , подтверждая выраженные гидрофобные характеристики материала [14].

2. Площадь поверхности: увеличивая удельную поверхность электрода посредством модификации электродного материала удастся существенно расширить область контакта микроорганизмов с поверхностью электрода, за счёт увеличения шероховатости поверхности углеродного войлока. Изменение морфологии поверхности связано с увеличением шероховатости за счёт коррозии углеродных волокон (глубина продольных борозд достигает 50-100 нм) [15]. Формируется трёхмерная структура с увеличенной удельной поверхностью (в 1,8 раз) [16].

3. Биосовместимость: за счет применения биологически совместимых материалов обеспечивается оптимальное развитие и размножение микробиологических сообществ, повышая эффективность работы микробных топливных элементов. Улучшается транспорт ионов и адсорбция микробных клеток [15].

Шероховатая поверхность с кислородными группами усиливает прикрепление бактерий за счет увеличения адгезии электрогенерирующих бактерий, таких как *Proteobacteria* и *Geobacter* [14].

4. Модификация углеродного войлока сопровождается увеличением концентрации поверхностных кислородсодержащих функциональных групп, среди которых доминируют гидроксильные (-OH) и карбоксильные (-COOH) группы. HNO_3 индуцирует появление карбонильных ($\text{C}=\text{O}$), гидроксильных ($\text{C}-\text{OH}$) и лактонных ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$) групп [16], в то же время H_2O_2 усиливает окисление, формируя карбоксильные (-COOH) группы, способствующие интенсификации межфазных взаимодействий с молекулами воды [17]. Сочетанное воздействие $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ увеличивает О/С-соотношение до 0,33, улучшая электрохимическую активность. Карбоксильные группы выступают медиаторами, ускоряя перенос заряда (плотность тока возрастает в 2,85 раз).

Гидрофильная поверхность поддерживает оптимальную влажность матрикса, предотвращая дегидратацию и обеспечивая стабильность биоплёнки. Показано, что оптимальные параметры обработки электрода были достигнуты при последовательной выдержке материала в 40%-ном растворе HNO_3 и 30%-ном растворе H_2O_2 при 80°C в течение 2 часов, что увеличивает мощность МТЭ на 180% [14].

Рассматривая другие варианты обработки электродов из углеродного войлока, можно отметить вариант, представленный в работе Чжан Цункюань, Цзэн Сяолань, Сюй Сяотан и др., где при обработке анодов $\text{PDA-Fe}_3\text{O}_4$ выходное напряжение увеличилось с 340 мВ до 586 мВ, что составляет 72,4% роста [18]. Также существует работа Эгидиус Гришконис, Арминас Ильгинис, Илона Йонушкене и др., где электроды подвергались обработке р-фенилендиамином, что позволило увеличить выходное напряжение двухкамерного микробного топливного элемента на 32% [19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструкция микробного топливного элемента. Классическая конфигурация микробного топливного элемента представляет собой двухкамерную систему, где анодное и катодное пространства разделены протонообменной мембраной. Мембрана обеспечива-

ет транспорт протонов из анодной камеры в катодную и препятствует обратной диффузии кислорода, что позволяет поддерживать стабильную анаэробную среду в анодной камере, где микроорганизмы катализируют окисление органических соединений, в результате чего высвобождающиеся электроны направляются на анод. Возникающая разность потенциалов между анодом и катодом обеспечивает прохождение электрического тока по внешней цепи, что отражает активность биоэлектрохимического процесса и используется в качестве показателя работы МТЭ.

Протонообменные мембраны, несмотря на способность повышать выходную мощность МТЭ по сравнению с безмембранными конфигурациями, остаются одним из наиболее дорогостоящих компонентов системы [20].

В настоящем исследовании использовалась двухкамерная конструкция МТЭ с одинаковым эффективным объемом анодной и катодной камер, составляющим 170 мл. Камеры разделялись протонообменной мембраной Nafion 115 (площадь 4 см^2). В качестве анода применялся углеродный войлок (5 см^2 , толщина 5 мм), катод был выполнен также из углеродного войлока (5 см^2 , толщина 8 мм). Углеродный войлок является одним из наиболее частым в применении материалом в рамках использования анодных материалов [21]. Схематичное представление используемого в рамках работы микробного топливного элемента изображено на рис. 1. Для исключения доступа кислорода анодная камера была герметично закрыта, что обеспечивало поддержание анаэробных условий в течение всего эксперимента. Катодная камера напротив, аэрируема при помощи аквариумного компрессора.

В качестве субстрата использовался активный ил с очистных сооружений г. Санкт-Петербурга. В рамках эксперимента использовались две установки МТЭ, в одной углеродный войлок не подвергался обработке, во второй – производилась подготовка смешанным реактивом.

Подготовка электродов. Углеродный войлок, подготовленный под размеры ячеек (5 см^2), был обработан смешанным реактивом HNO_3 и H_2O_2 в соотношении 1:1. Концентрация HNO_3 составляла 65% (хч), H_2O_2 – 35% (осч 8-4). Анодные материалы погружали в 200 мл смешанного реактива и подвергали ультразвуковому воздействию при помощи

ультразвуковой ванночки при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем нагревали в муфельной печи при 450 °С в течение 30 минут. Полученные образцы неоднократно

промывались до установления нейтрального pH. Далее образцы сушили при температуре 60 °С в течение 4-х часов для получения модифицированного анодного материала [14].

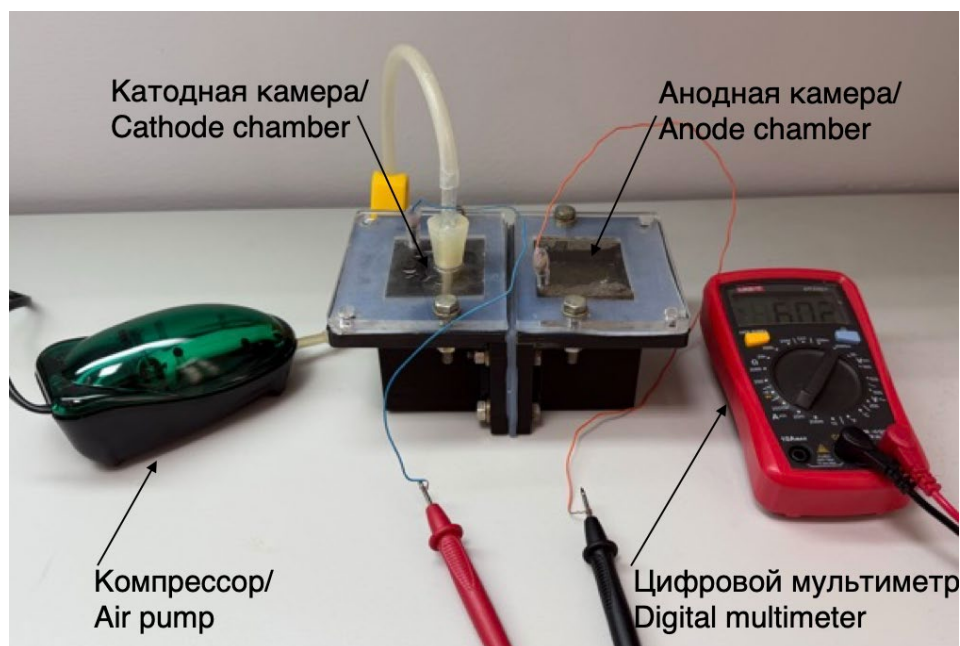


Рис. 1. Установка двухкамерного микробного топливного элемента.¹

Регистрация выходного напряжения. Производительность микробных топливных элементов оценивалась на основе регистраций выходного напряжения. Для получения стабильных и воспроизводимых данных напряжение регистрировалось с использованием цифрового мультиметра, с периодичностью, достаточной для отслеживания динамики генерации электроэнергии в течение всего периода эксперимента. Полученные данные использовались для количественной оценки эффективности работы биоэлектрохимической системы в зависимости от модификации анодного материала.

Анализ биоплёнок методом световой микроскопии. Для подготовки образца к световой микроскопии были выполнены следующие шаги, основанные на стандартных процедурах для окраски фиксированных мазков. Небольшие образцы углеродного войлока были аккуратно извлечены из МТЭ для сохранения биоплёнки на поверхности. Далее образцы углеродного войлока с биоплёнкой были помещены на обезжиренные микроскопические стекла, где была проведена окраска генциановым фиолетовым непосредственно биоплёнки, находящейся на углеродном войлоке, без создания смазов для сохранения образо-

вавшейся структуры. Наблюдения производились под световым микроскопом Carl Zeiss Primo Star с увеличением 40x и 100x под иммерсией. Размеры биоплёнки были измерены на основе видимых структур.

Анализ биоплёнок методом сканирующей электронной микроскопии. Для изучения морфологии образованной биоплёнки, а также анализа структурных и визуальных различий между модифицированными и не модифицированными образцами электродного материала проводились световая и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Исследование осуществлялось на базе Центра коллективного пользования «Нанотехнологии» Университета ИТМО с использованием сканирующего электронного микроскопа FEI Inspect S (Чехия) при увеличении 30 000x. Образцы предварительно подвергались процедуре дегидратации и напылению проводящего слоя (золото/платина), что обеспечивало высокое качество визуализации поверхности углеродного войлока и сформированной на нём микробной биоплёнки. СЭМ-анализ позволил установить наличие различий в степени колонизации анодного материала, плотности распределения микробных клеток, а также выявить текстурные особенности, обу-

¹ Appendix 1

словенные модификацией поверхности электрода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Влияние обработки электродов на физико-химические свойства. Свойства электродов, особенно анодных компонентов, оказывают определяющее влияние на эффективность функционирования микробиологических топливных элементов.

На рисунке 2 представлен материал электрода до и после обработки смешанным реактивом, показывая видимые различия в структуре (рис. 2 а), а также поведение воды на их поверхности (рис. 2 б).

Анализ визуального представления рис.2 а демонстрирует, что модифицированная форма электрода (I) характеризуется гладкой, гомогенной поверхностью без выраженных признаков микропористости, тогда как стандартный образец (II) углеродного войлока отличается развитой пористой структурой. Цветовая гамма обоих материалов идентична – чёрный тон, однако визуально

модифицированный вариант обладает повышенными отражающими свойствами, приобретая глянец, в отличие от обычного образца, характеризующегося низким уровнем блеска (матовый эффект).

Сравнивая гидрофильные свойства (рис. 2 б), на модифицированном углеродном войлоке вода сразу впиталась, когда как на обычном углеродном войлоке вода осталась в виде капли.

Следовательно, целенаправленная предварительная обработка электродов представляет собой важный этап в оптимизации конструкции микробных топливных элементов, обеспечивающий существенное улучшение ключевых физико-химических параметров электродов – гидрофильно-адсорбционной способности поверхности и биологической совместимости, оказывающих непосредственное влияние на процесс био-электрохимического преобразования энергии. На следующем этапе были проведены сравнительные исследования по электрогенерации с использованием обработанного электрода.

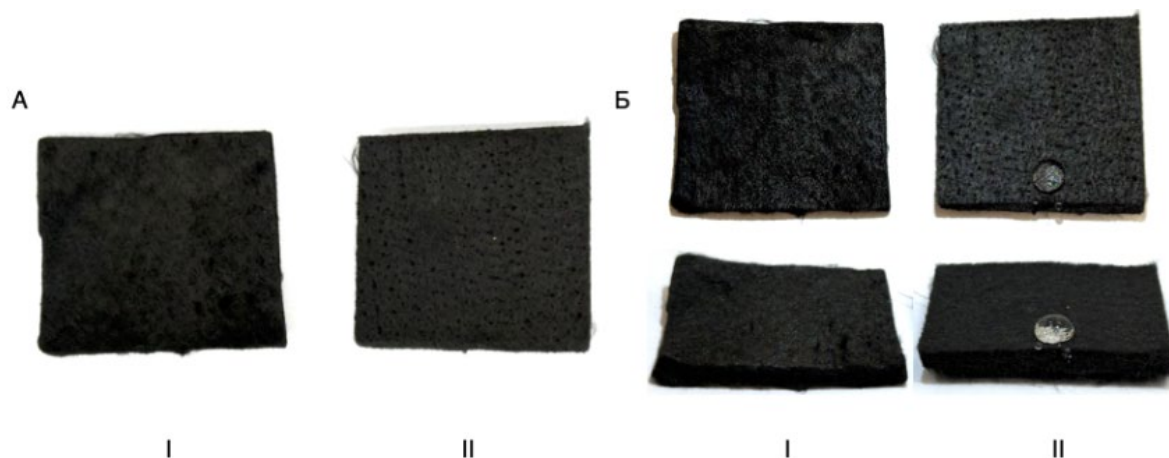


Рис. 2. Вид модифицированного и стандартного образца углеродного войлока.²

Сравнение выработки энергии от МТЭ с обработанным и необработанным электродом. Для проведения исследований по выработке электроэнергии в сравнении с модифицированным электродом было организовано два варианта двухкамерных установок МТЭ. В первой установке применялись необработанные электроды, тогда как во второй установке использовался обработанный электрод смешанным реактивом по схеме, описанной выше.

Эксперимент проходил следующим образом: после полной загрузки обеих конструк-

ций МТЭ, где анодная камера заполнялась активным илом, а катодная – водой, производилось систематическое измерение выходных напряжений с обоих устройств. Для каждой ячейки фиксировались показания приборов в течение всего периода наблюдения, обеспечивая регулярность записей.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке, в результате которой были получены следующие значения результатов эксперимента по выработке электроэнергии (рис. 3).

² Appendix 1

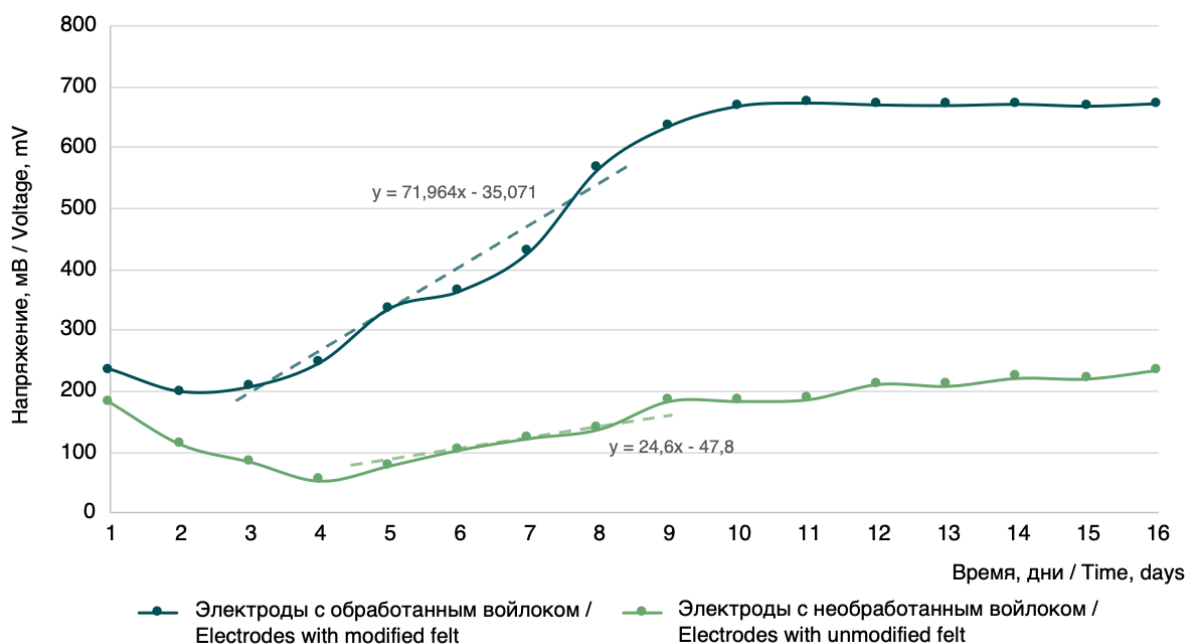


Рис. 3. Генерация электроэнергии от двух моделей МТЭ.³

Анализируя графики напряжения, выдаваемого МТЭ, можно выделить следующие зависимости, связанные с образованием биоплёнок на анодном материале. Для электрода с обработанным войлоком можно проследить следующую тенденцию. С 1 по 3 день можно отметить, что напряжение снижается с ~240 мВ до 200 мВ, что соответствует адаптации бактерий к поверхности анода на начальной фазе прикрепления бактерий. Далее напряжение возрастает до ~500 мВ, указывая на активное размножение бактерий и развитие биоплёнки, что в свою очередь влияет на улучшение переноса электронов. Напряжение стабилизируется, достигая пика около 680 мВ, что свидетельствует о формировании зрелой биоплёнки с максимальной электроактивностью.

МТЭ с необработанным электродом показал себя иначе, напряжение падало с 180 мВ до 50 мВ, что указывает на более медленное начальное прикрепление бактерий к аноду, затем напряжение медленно росло до 220–240 мВ, что отражает более длительный процесс формирования биоплёнки, чем на электроде, подвергнутому обработке смешанным реактивом.

Обработанный анод обеспечивает более быстрое и эффективное формирование биоплёнки, что приводит к достижению выдаваемого напряжения в 680 мВ, что больше в 2,95 раз чем у необработанного анода. Данные различия обусловлены биосовместимо-

стью и свойствами поверхности материалов, что подтверждается исследованиями, демонстрирующими преимущества углеродсодержащих и модифицированных анодов за счёт доступности гидрофильных функциональных групп на поверхности материала после обработки смешанным реактивом.

Рассматривая зоны на графиках, отражающие развитие биоплёнки на поверхности анода, при добавлении линейной линии тренда можно сравнить скорости роста напряжения, где коэффициент наклона (скорость роста напряжения) для обработанного электрода составила 71,9 мВ/день, когда как для необработанного – 24,6 мВ/день. Сравнение наклонов показывает, что скорость роста напряжения для обработанного электрода в 2,93 раза выше, что можно представить как ключевой показатель, отражающий различия в производительности.

Благодаря отслеживанию динамики выходного напряжения с МТЭ можно оценить стадии образования биоплёнок на анодном материале, что представлено на рис. 4.

Начальный этап (адгезия) характеризуется минимальной электрохимической активностью, что часто проявляется в снижении напряжения из-за адаптации микробного сообщества. Анализируя полученные результаты, можно отметить, что данная стадия, для обработанного электрода, охватывает дни 1–3, что указывает на более быстрое завершение адгезии благодаря улучшенной поверх-

³ Appendix 1

ности, когда как на необработанном электроде адгезия составляет 1–4 дня, что говорит о

более медленном процессе из-за меньшей пригодности электрода.

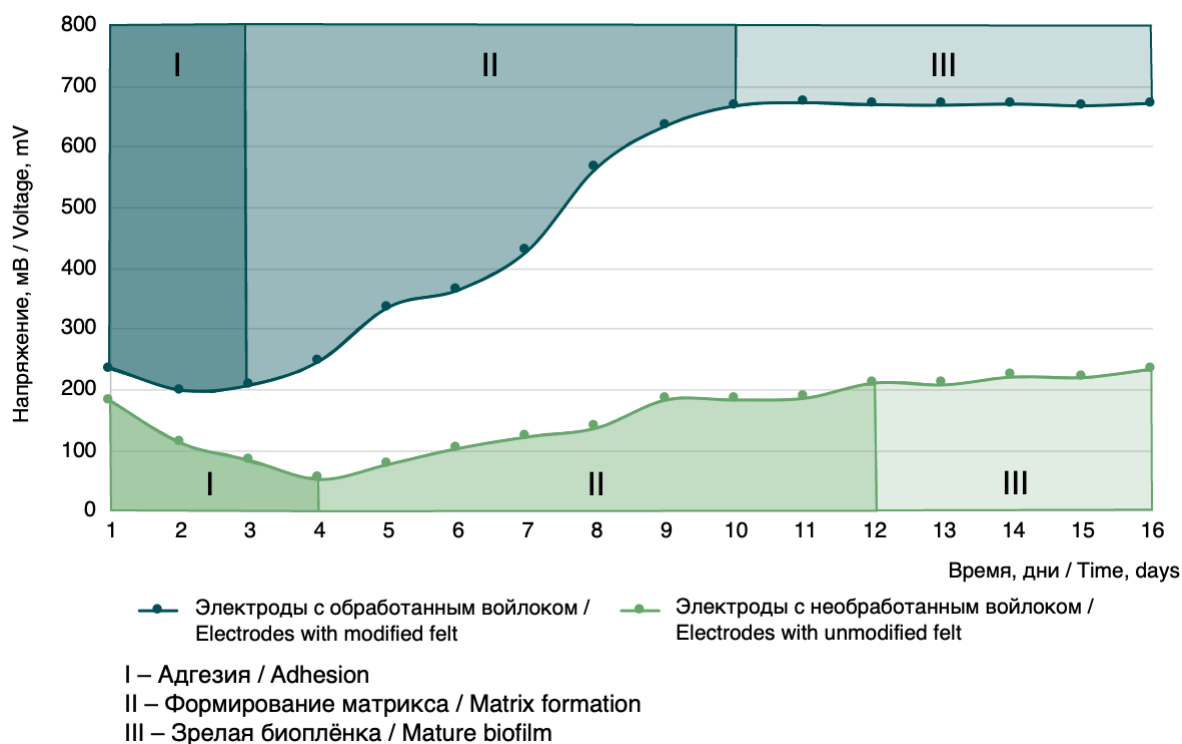


Рис. 4. Динамика напряжения МТЭ с обработанным и необработанным электродами на этапах формирования биоплёнки.⁴

Формирование матрикса включает рост микроколоний, что приводит к увеличению напряжения из-за роста биоплёнки. Для микробного топливного элемента с обработанным электродом данная стадия начинается с 3-го дня и продолжается 7 дней, до выхода значений до относительно постоянных значений, соответствующих уде состоянию зрелой биоплёнки. Для необработанного электрода формирование матрикса начинается с 4-го дня и продолжается 8 дней более медленным ростом.

Можно сказать, что обработка электрода смешанным реактивом значительно ускоряет формирование биоплёнки, сокращая время адгезии и формирования матрикса, а также обеспечивая более зрелую и активную биоплёнку.

Анализ биоплёнок методом световой микроскопии. Микроскопирование окрашенных мазков позволило детально изучить структуру биоплёнки на поверхности углеродного войлока, извлечённого из микробного топливного элемента. Тщательная подготовка образцов, включающая аккуратное извлечение войлока и проведение окраски непосредственно на его поверхности, обеспечила со-

хранение целостности биоплёнки и её естественной структуры.

На рисунке 5 представлены результаты световой микроскопии, демонстрирующие различия в морфологии и распределении биоплёнки на обработанном и необработанном углеродном войлоке, отражая влияние обработки поверхности на формирование биоплёнки. На обработанном войлоке (рис. 5 а) биоплёнка представлена структурами с плотными участками матрикса биоплёнки, особенно заметными вокруг волокон углеродного войлока. Например, наблюдается утолщенный участок размером 6 на 13 мкм на первом изображении и 15 на 10 мкм на втором изображении, что указывает на более организованную биоплёнку. На необработанном войлоке (рис. 5 б) также присутствуют структуры, но менее выраженные, размерами 4 на 6 мкм, что может указывать на менее равномерное распределение биоплёнки.

На обработанном войлоке (рис. 5 а) биоплёнка представлена структурами с плотными участками матрикса биоплёнки, особенно заметными вокруг волокон углеродного войлока. Например, наблюдается утолщенный участок размером 6 на 13 мкм на первом

⁴ Appendix 1

изображении и 15 на 10 мкм на втором изображении, что указывает на более организованную биоплёнку. На необработанном войлоке (рис. 5 б) также присутствуют структу-

ры, но менее выраженные, размерами 4 на 6 мкм, что может указывать на менее равномерное распределение биоплёнки.

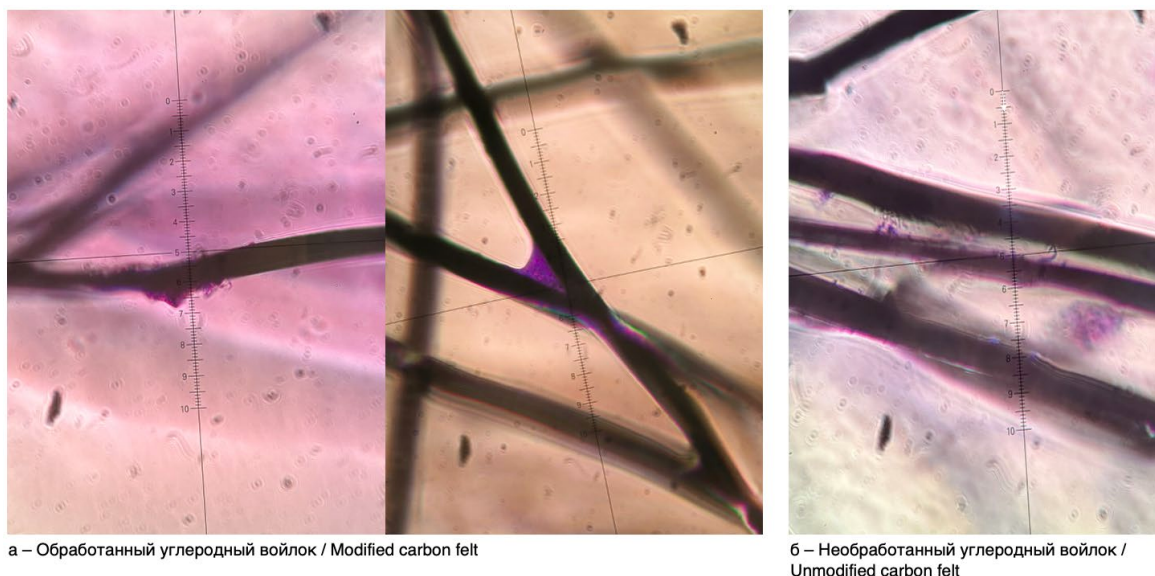


Рис. 5. Изображения световой микроскопии электродов микробного топливного элемента (увеличение 100х).⁵

Биоплёнка на обработанном электроде имеет более высокую локальную плотность, особенно вокруг волокон, что подтверждается наличием утолщенных участков и более выраженной окраской; на необработанном материале биоплёнка имеет менее равномерное распределение.

Характеристика поверхности электродов оказывает существенное воздействие на межфазное взаимодействие между микроорганизмами и материалом электрода, формируя специфическую морфологию бактериальной биоплёнки, что согласуется с выводами проведённого экспериментального анализа.

Анализ биоплёнок методом СЭМ. На основе сканирующей электронной микроскопии были проанализированы три образца, представленных на рис. 6 – обработанный углеродный войлок без биоплёнки (а), обработанный (б) и необработанный (в) образцы с образовавшейся биоплёнкой после работы микробного топливного элемента. На изображении обработанного углеродного войлока до работы МТЭ (при увеличении 31 000х) можно отметить, волокна выглядят гладкими и ровными, с минимальными неровностями, однако заметна микроскопическая шероховатость, образованная вследствие обработки электрода. Далее, обращаясь к рисунку 6б (увеличение 30 000х), что соответствует обработанному электроду после работы в МТЭ,

можно отметить, что поверхность волокон покрыта достаточно плотным слоем бактериальных клеток, образующих биоплёнку. Клетки распределены равномерно, с заметными скоплениями, напоминающими микроколонии. Между клетками виден внеклеточный матрикс, скрепляющий биоплёнку, что указывает на зрелое состояние. На рисунке 6в (увеличение 30 000х) биоплёнка присутствует, но менее плотная по сравнению с обработанным войлоком. Клетки распределены неравномерно, количество бактерий значительно меньше.

Анализ СЭМ-изображений показывает, что обработка анода смесью $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ создает благоприятные условия для формирования биоплёнки, делая ее более плотной и равномерной, что улучшает электрогенез. Необработанный войлок демонстрирует менее развитую биоплёнку с неравномерным распределением клеток, что ограничивает его эффективность в работе МТЭ.

На рисунке 7 представлены механизмы переноса электронов, описанные выше. Зрелая биоплёнка обладает выраженной трёхмерной структурой, водными каналами и значительной толщиной. Завершающим этапом является отделение отдельных микроорганизмов от биоплёнки. На рисунке 8 представлен механизм формирования биоплёнки на поверхности углеродного войлока.

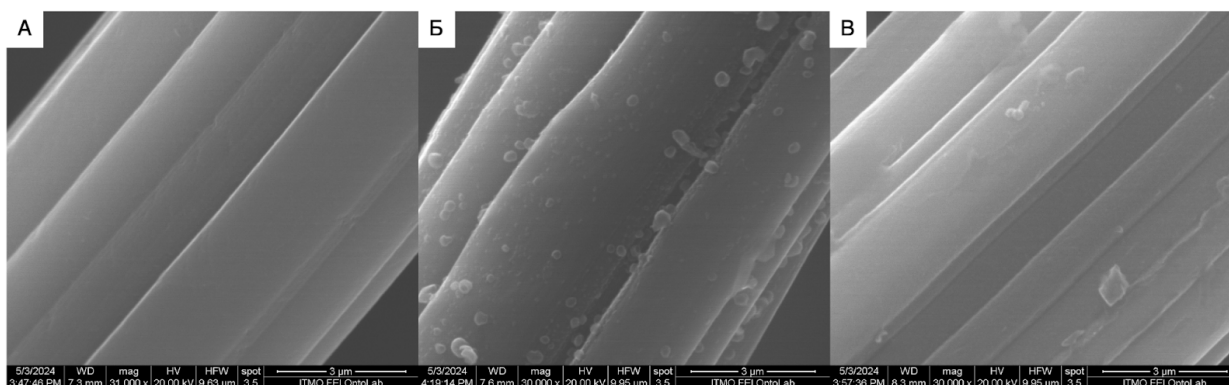


Рис. 6. СЭМ-изображения электродов микробного топливного элемента до (а) и после (б,в) работы (увеличение 30 000х).⁶

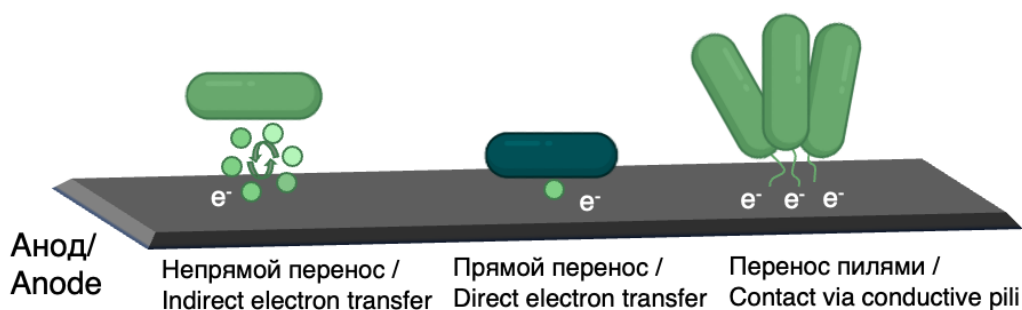


Рис. 7. Механизмы переноса электронов.⁷

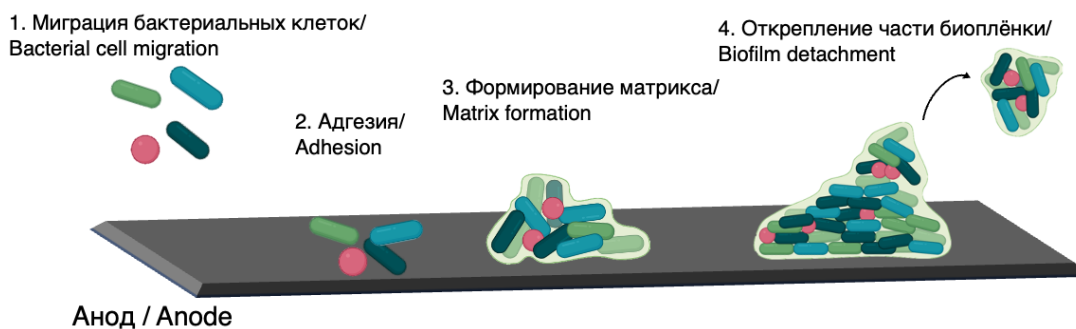


Рис. 8. Стадии развития биоплёнки на поверхности.⁸

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа иллюстрирует значительное повышение эффективности функционирования микробных топливных элементов посредством модификации анода, выполненного из углеродного войлока раствором азотной кислоты/пероксида водорода в соотношении 1:1. Установлено, что обработка анодов данным составом стимулирует формирование электроактивной биоплёнки и улучшает параметры биоэлектрогенеза. Аноды после обработки характеризуются ускоренным развитием процесса выработки напряжения, достигая максимума потенциала в ~680 мВ на

десятый день работы системы, тогда как потенциал необработанного анода достигает уровня в 250 мВ на шестнадцатый день эксплуатации.

Улучшение выработки напряжения обусловлено изменением физико-химических характеристик поверхности анода, включая увеличение степени гидрофильности (уменьшение угла контакта), рост поверхностной микрошероховатости и образование кислородсодержащих функциональных групп (-ОН, -СООН), способствующих усилению бактериальной адгезии и облегчающих транспорт электронов от микроорганизмов к

электроду. Анализ методами световой и сканирующей электронной микроскопии подтвердил, что структура сформированной биоплёнки на обработанном аноде характеризуется повышенной компактностью, однородностью распределения клеток и развитым внеклеточным матриксом, отражающим высокую степень зрелости и электрической активности микробиоты.

Таким образом, полученные данные подтверждают перспективность метода химического модифицирования анодов для оптимизации конструктивных решений МТЭ, направленного на повышение энергетической продуктивности и стабильности устройств данного типа. Подобная технология имеет потенциальное практическое значение в области биотехнологий. В качестве дальнейших направлений исследований предлагается детальное изучение состава формирующихся микробных консорциумов, оценка долговременной работоспособности предложенного материала и разработка подходов к увеличению масштаба реализации применения данной технологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Нанотехнологии» Университета ИТМО за предоставленные возможности использования сканирующего электронного микроскопа FEI Inspect S (Чехия) для проведения исследований.

APPENDIX 1 (ПРИЛОЖЕНИЕ 1)

¹**Fig. 1.** Work model of the dual-chamber microbial fuel cell (MFC)

²**Fig. 2** Modified and unmodified carbon felt samples

³**Fig. 3.** Electricity generation by two MFC configurations

⁴**Fig. 4.** Voltage dynamics of MFCs with modified and unmodified electrodes during biofilm formation stages

⁵**Fig. 5.** Light microscopy images of MFC electrodes (100× magnification)

⁶**Fig. 6.** SEM images of MFC electrodes before (a) and after (b, c) system working (30,000× magnification)

⁷**Fig. 7.** Mechanisms of electron transfer

⁸**Fig. 8.** Stages of biofilm development on the electrode surface

Литература (References)

[1] Zhu K., Xu Y., Yang X., Fu W., Dang W., Yuan J., Wang Z. Sludge Derived Carbon Modified Anode in Microbial Fuel Cell for Performance Im-

provement and Microbial Community Dynamics. *Membranes*, 2022, vol. 12, no. 2, p. 120. doi: 10.3390/membranes12020120

[2] Xiao N., Wu R., Huang J. J., Selvaganapathy P. R. Anode surface modification regulates biofilm community population and the performance of micro-MFC based biochemical oxygen demand sensor. *Chemical Engineering Science*, 2020, vol. 221, p. 115691. doi: 10.1016/j.ces.2020.115691

[3] Guo Z., Zhang L., Cui M.-H., Wang A. Electrode Microbial Communities Associated with Electron Donor Source Types in a Bioelectrochemical System Treating Azo-Dye Wastewater. *Water*, 2022, vol. 14, no. 9, p. 1505. doi: 10.3390/w14091505

[4] Yu F., Wang C., Ma J. Applications of Graphene-Modified Electrodes in Microbial Fuel Cells. *Materials*, 2016, vol. 9, no. 10, p. 807. doi: 10.3390/ma9100807

[5] Metody indikatsii biologicheskikh plenok mikroorganizmov na abioticheskikh ob"ektakh: Metodicheskie rekomendatsii [Methods for indicating biological films of microorganisms on abiotic objects: Methodological recommendations]. Moscow, Federal'naia sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteli i blagopoluchia cheloveka [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare], 2020. 20 p.

[6] Read S. T., Dutta P., Bond P. L., Keller J., Rabaey K. Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. *BMC Microbiology*, 2010, vol. 10, p. 98. doi: 10.1186/1471-2180-10-98

[7] Ouaknin Hirsch L., Gandu B., Chiliveru A., Amar Dubrovin I., Rozenfeld S., Schechter A., Cahan R. The Performance of a Modified Anode Using a Combination of Kaolin and Graphite Nanoparticles in Microbial Fuel Cells. *Microorganisms*, 2024, vol. 12, no. 3, p. 604. doi: 10.3390/microorganisms12030604

[8] Yaqoob A. A., Mohamad Ibrahim M. N., Rafatul-ah M., Chua Y. S., Ahmad A., Umar K. Recent Advances in Anodes for Microbial Fuel Cells: An Overview. *Materials*, 2020, vol. 13, no. 9, p. 2078. doi: 10.3390/ma13092078

[9] Greenman J., Gajda I., You J., Mendis B. A., Obata O., Pasternak G., Ieropoulos I. Microbial fuel cells and their electrified biofilms. *Biofilm*, 2021, vol. 3, p. 100057. doi: 10.1016/j.biofilm.2021.100057

[10] Rabaey K., Boon N., Höfte M., Verstraete W. Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells. *Environmental Science & Technology*, 2005, vol. 39, no. 9, pp. 3401–3408. doi: 10.1021/es048563o

[11] Torres C. I., Marcus A. K., Lee H.-S., Parameswaran P., Krajmalnik-Brown R., Rittmann B. E. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, vol. 34,

- no. 1, pp. 3–17. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00191.x
- [12] Reguera G., McCarthy K. D., Mehta T., Nicoll J. S., Tuominen M. T., Lovley D. R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 2005, vol. 435, no. 7045, pp. 1098–1101. doi: 10.1038/nature03661
- [13] Veerubhotla R., Varanasi J. L., Das D. Biofilm Formation Within Microbial Fuel Cells. *Progress and Recent Trends in Microbial Fuel Cells*, 2018, pp. 231–242.
- [14] Zhao Y., Ma Y., Li T., Dong Z., Wang Y. Modification of carbon felt anodes using double-oxidant HNO₃/H₂O₂ for application in microbial fuel cells. *RSC Advances*, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 2059–2064. doi: 10.1039/C7RA12923H
- [15] Nohara L. B., Petraconi Filho G., Nohara E. L., Kleinke M. U., Rezende M. C. Evaluation of carbon fiber surface treated by chemical and cold plasma processes. *Materials Research*, 2005, vol. 8, no. 3, pp. 281–286. doi: 10.1590/S1516-14392005000300010
- [16] Kim G., Lee H., Kim M., Kim D. U. Investigating the Effects of Nitric Acid Treatments on the Properties of Recycled Carbon Fiber. *Polymers*, 2023, vol. 15, no. 4, p. 824. doi: 10.3390/polym15040824
- [17] Takaoka M., Yokokawa H., Takeda N. The effect of treatment of activated carbon by H₂O₂ or HNO₃ on the decomposition of pentachlorobenzene. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2007, vol. 74, no. 3–4, pp. 179–186. doi: 10.1016/j.apcatb.2007.02.009
- [18] Zhang C., Zeng X., Xu X., Nie W., Dubey B. K., Ding W. PDA-Fe₃O₄ decorated carbon felt anode enhancing electrochemical performance of microbial fuel cells: Effect of electrode materials on electroactive biofilm. *Chemosphere*, 2024, vol. 355, p. 141764. doi: 10.1016/j.chemosphere.2024.141764
- [19] Griškonis E., Ilginis A., Jonuškienė I., Raslavičius L., Jonynas R., Kantminienė K. Enhanced Performance of Microbial Fuel Cells with Anodes from Ethylenediamine and Phenylenediamine Modified Graphite Felt. *Processes*, 2020, vol. 8, no. 8, p. 939. doi: 10.3390/pr8080939
- [20] Ghasemi M., Wan Daud W. R., Ismail M., Rahimnejad M., Ismail A. F., Leong J. X., Miskan M., Liew K. B. Effect of pre-treatment and biofouling of proton exchange membrane on microbial fuel cell performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, vol. 38, no. 13, pp. 5480–5484. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.02.098

Сведения об авторах.



Гладышева Марина Сергеевна,
магистрант факультета
Экотехнологий Университета
ИТМО, обл. научных интересов:
экобиотехнология,
экологический мониторинг.
E-mail: msgladysheva@itmo.ru



Молодкина Нелли Ринатовна,
к.т.н., доцент, заведующий лабо-
раторией факультета Экотехно-
логий Университета ИТМО, обл.
научных интересов: экобиотех-
нология, микробиологическая
деструкция.
E-mail: nrmolodkina@itmo.ru